

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-252783

(43)Date of publication of application : 30.09.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
C12Q 1/68

(21)Application number : 08-095971

(71)Applicant : NIPPON SUISAN KAISHA LTD

(22)Date of filing : 26.03.1996

(72)Inventor : KASUTOUURI BUENKATESUWARAN
DOMOTO NOBUHIKO

(54) NUCLEOTIDE FOR DETECTING VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AND DETECTION USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new nucleotide having a specific base sequence, specifically reacting with *Vibrio parahaemolyticus* gyrB gene, capable of detecting *Vibrio parahaemolyticus* as a primer capable of distinguishing and identifying from other vibrio series or a microbial strain other than the genus *Vibrio*.

SOLUTION: This new nucleotide has a base sequence represented by formulas I or II and specifically reacts with gyrB gene of *Vibrio parahaemolyticus* and is useful for detection method of *Vibrio parahaemolyticus* due to polymerase chain reaction(PCR) as a pair of primers capable of distinguishing and identifying *Vibrio parahaemolyticus* from other vibrio series and a microbial strain other than vibrio. The nucleotide is obtained by investing a base sequence of DNA gyrase subunit B gene (gyrB) of *Vibrio parahaemolyticus*, determining a base sequence of a primer set capable of distinguishing from gyrB of *Vibrio alginolyticus* and proliferating the gene and synthesizing the base sequence by using DNA automatic synthesizer.

GGG GGT GGG GGT TTT GGT AGT

TGG GGT TGG GGG TCA TCA ATA

II

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-252783

(43)公開日 平成9年(1997)9月30日

(51)IntCl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平8-95971

(22)出願日 平成8年(1996)3月26日

(71)出願人 000004189

日本水産株式会社

東京都千代田区大手町2丁目6番2号

(72)発明者 カストゥーリ ヴェンカテスワラン

八王子市北野町559-6 日本水産株式会
社中央研究所内

(72)発明者 堂本 信彦

八王子市北野町559-6 日本水産株式会
社中央研究所内

(74)代理人 弁理士 須藤 阿佐子

(54)【発明の名称】 腸炎ビブリオ検出のためのヌクレオチドおよびそれを用いた検出法

(57)【要約】

【構成】 配列CGG CGT GGG TGT TT
C GGT AGTを含むヌクレオチド。配列TCC
GCT TCG CGC TCA TCA ATAを含
むヌクレオチド。上記二つのヌクレオチドからなるブラ
イマーセットを用いて検体中のDNAジャイレースサブ
ユニットB遺伝子検体中に腸炎ビブリオに特異的な配列
を標的とし、当該標的核酸配列を選択的に増幅させ、検
体中に特異的なg y r Bユニットが存在するか否かを決定
することで腸炎ビブリオの検出を行う方法。

【効果】 腸炎ビブリオのg y r B遺伝子に特異的に反
応して、他のビブリオ種及びビブリオ属以外の菌株から
区別、同定できるようなプライマーを提供することがで
きた。腸炎ビブリオ特異的プライマーにより、DNAの
抽出等の操作なしで、菌細胞からの腸炎ビブリオ特異的
な285bpのg y r B遺伝子断片をPCR法により検
出できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1を含むヌクレオチド。

【請求項2】 配列番号2を含むヌクレオチド。

【請求項3】 配列番号1を含むヌクレオチドと配列番号2を含むヌクレオチドからなるプライマーセットを用いて検体中のDNAジャイレースサブユニットB遺伝子配列を標的とし、当該標的核酸配列を選択的に増幅させ、検体中に腸炎ビブリオに特異的なgyrBユニットが存在するか否かを決定することで腸炎ビブリオの検出を行う方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、腸炎ビブリオ (*Vibrio parahaemolyticus*) に特徴的な核酸標的配列の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーに関する。本発明は、DNAジャイレースサブユニットB遺伝子 (gyrB) 特異的プライマーを用いたポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) による腸炎ビブリオの検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】腸炎ビブリオは多くの国で食中毒菌として知られている。腸管以外の部位や術後傷にも認められる。腸炎ビブリオはグラム陰性多形性桿状菌であり、好塩性通性嫌気性菌で炭水化物を発酵してガスを発生する。チオ硫酸-クエン酸塩-胆汁酸塩-蔗糖 (TCBS) 寒天培地上に緑色のコロニーを形成する。

【0003】腸炎ビブリオを検出するには通常、増菌培地を用いて培養し、選択的平板培養法により単離する方法が用いられる。従来の検出法は1週間を要するので、もっと迅速な方法が望まれている。トリプシン活性を測定する蛍光アッセイ法は腸炎ビブリオを迅速に検出するが、腸炎ビブリオをビブリオ アルジノリティカス、ビブリオ ハーベイと区別できない。腸炎ビブリオとビブリオ アルジノリティカスの16S rRNA配列は99.7%の相同性を示すので腸炎ビブリオとビブリオ アルジノリティカスを同定するには時間のかかる方法しか無かった。

【0004】ビブリオ属は37の種からなる。いずれも水性環境に由来するものである。rDNAの系統学的データによると *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *V. damsela* として知られている種は新しく設立された *Listonella* 属、*Photobacterium* 属に移されている。10種が胃腸炎、傷の感染、ヒトの敗血症に関連しており、7種が魚の病原菌として知られている。腸炎ビブリオは通常河口や海といった環境に生息しており、しばしば夏期に海水や魚介類から単離される。

【0005】腸炎ビブリオを単離、同定するには、検体を bromothymol blue-teepol 寒天培地又は TCBS 寒天培地等の選択培地に接種し、青

みがかった緑色のコロニーを単離し、そのコロニーの生化学的性質を調べる。残念ながら、多くのビブリオの種が同様の反応を示すので、確かな同定をするにはさらに詳細な生化学的試験が必要になる。多数の単離菌株について広範囲な生化学的性質を調べるには多くの労力と時間と費用を要する。腸炎ビブリオの血清学的同定法は他のビブリオと交差反応を示す。

【0006】先にDNAを利用するビブリオの種の同定法が開発されている。*V. cholerae* O1からのコレラ毒素オペロンを増幅させて特異的にこの菌を同定できるDNAプローブが用いられた。これらのプローブはコレラ毒素を生産するコレラ菌以外のビブリオとも交差反応する。蛍光ラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いてメンブランフィルター上でハイブリダイゼーションを行い *V. vulnificus* を同定する方法も研究されている (Wright, A. C. et al., Appl. Environ. Microbiol. 59: 541-546, 1993)。

【0007】さらに *V. vulnificus* のサイトリジン遺伝子 (hlyA) 配列の部分からの共有結合でラベルしたオリゴヌクレオチドDNAプローブが作製された。これらのプローブは非毒性 *V. vulnificus* とは反応せず、したがって全ての *V. vulnificus* を検出しない。同様に、毒性因子 (tdh, tth 遺伝子) をターゲットにした他の分子学的方法も毒素を生産する腸炎ビブリオを検出することはできる。しかし、この毒性因子を用いた場合、すべての腸炎ビブリオを検出することはできない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は腸炎ビブリオを他の36種のビブリオ属の菌と区別できる検出法の提供を目的とする。腸炎ビブリオ特異的プライマーによりDNAの抽出等の操作なしで、菌細胞からの腸炎ビブリオ特異的な285bpの gyrB 遺伝子断片をPCR法により検出する方法の提供を目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】PCRに有用なオリゴヌクレオチドプローブを提供するため、本発明は、腸炎ビブリオに特徴的な核酸標的配列の増幅のためのオリゴヌクレオチドプライマーに関する。これらのプライマーは、配列番号1および2を含み、そしてプライマーセットとして、腸炎ビブリオに特徴的な核酸標的配列の検出に使用される。

【0010】プライマーセットは、腸炎ビブリオに特徴的な核酸標的配列の在否の決定に関する方法に使用する。腸炎ビブリオ特異的プライマーにより、DNAの抽出等の操作なしで、細胞からの腸炎ビブリオ特異的な285bpの gyrB 遺伝子断片がPCR法により検出できる。

【0011】本発明において、「プライマー」は、標的

核酸配列のあるセクションへのハイブリダイズを許す特異的ヌクレオチド配列をデザインまたは選択により含む、合成によるかまたは生物学的に生産されたオリゴヌクレオチドである。プライマーは、ポリメラーゼまたは同様な酵素により伸長合成されて完全な標的核酸配列にハイブリダイズすることができる。プライマーは核酸配列増幅法、例えばPCR法および鎖置換増幅（SDA）において利用される。特定のプライマーに、特にSDA技術において有用なものは、標的核酸にハイブリダイズ可能な配列に加えて、制限エンドヌクレアーゼの認識配列、およびポリメラーゼまたはポリメラーゼ様活性を継続する他の酵素がそれ自身その鑄型特異的オリゴヌクレオチド合成の開始を指示するための任意の配列を含む。「ハイブリダイゼーション」は、予め決定された反応条件下にて部分的または完全に相補的な核酸鎖が逆平行（アンチパラレル）様式にて向かい合うようにして、特異的かつ安定な水素結合により二本鎖の核酸を形成する工程である。

【0012】上記のとおり、本発明は、腸炎ビブリオに特異的な核酸標的配列の在否を決定するために有用なオリゴヌクレオチドプライマーに関する。そのような決定を行うための方法は、PCRを用いた遺伝子増幅法にとどまらず、従来技術であるサザンハイブリダイゼーション法等のプロープとしての使用も含む。本発明のプライマーは腸炎ビブリオのgyrBサブユニット遺伝子配列に特異的である。プロープはプライマー増幅産物内の内部コンセンサス配列に特異的である。

【0013】本発明者らは従来技術の上記問題を解決するために高特異性プロープとしてDNAジャイレース（トポイソメラーゼ▲||▼）のBサブユニット蛋白をコードするgyrB遺伝子を用いる方法を検討した。

【0014】gyrB遺伝子を直接シークエンスしたユニバーサルプライマーでPseudomonas putidaを検出、分類する方法が最近報告されている。これらのユニバーサルプライマーを用いて種々のグラム陰性菌、陽性菌のgyrB遺伝子部分がPCR法により増幅された。本発明者らはこれら既存のプライマーを用いて37種のビブリオ属のgyrBの部分1.2kbを増幅した。腸炎ビブリオ ATCC17802株、ビブリオ アルジノリチカス ATCC17749株のgyrB塩基配列を示した。

【0015】本発明者らはさらに腸炎ビブリオのgyrB遺伝子のみを増幅し、同定できるPCRプライマーを作製した。これら腸炎ビブリオ特異的プライマーの感度を調べるために118種の腸炎ビブリオの菌株、20種のビブリオ アルジノリチカスの菌株および、その他の菌株78種について検討した。

【0016】山本、原山（Appl. Environ. Microbiol. 61:1104-1109, 1995）らはDNA gyrase Bサブユニット蛋白のア

ミノ酸配列の保存された部位2カ所からgyrB遺伝子を増幅させるPCRプライマーを作製した。これらのプライマーを用いて、種々の細菌からおよそ1.2kbのgyrB遺伝子部分が増幅された。

【0017】腸炎ビブリオATCC17802株とビブリオ アルジノリチカス ATCC17749株から増幅されたgyrB遺伝子部分を遺伝子組み換えの常法（Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989）に従って適当なベクターによりクローン化した。好ましいベクターとしてpGEMzf（+）があげられるが、一般的なベクターであれば適宜選択して用いることができる。pGEMzf（+）によりクローン化された腸炎ビブリオの1.2kbのgyrB遺伝子部分はプラスミドpVPgyrB、ビブリオ アルジノリチカスからのものはpVAgyrBと呼ぶ。プロープの増殖も常法（Sambrook et al., 1989）によりなされる。例えば、プラスミドをベクターに挿入し、塩化カルシウムなどの有効な方法により大腸菌を形質転換する。形質転換した細胞は適正条件下で培養する。

【0018】目的とする遺伝子は菌体を溶解して回収し、アルカリ法等により精製する。精製したプラスミドをサンプルとして用いる。腸炎ビブリオをビブリオ アルジノリチカスを含む他のビブリオから検出、区別するためにPCR法を試みた。この方法はプロープに相同性のある配列を増幅するので、事実上、感度を増すことになる。プロープの塩基配列にしたがって、合成されたオリゴヌクレオチドプライマーは、サンプル中に目的とする塩基配列が存在する場合のみDNAを増幅する。感度を増加するだけでなく、DNAプロープの塩基配列に基づく特異的なオリゴヌクレオチドを使用することにより絶対的な特異性が得られる。

【0019】有効なプライマーを作製するために、pVPgyrBとpVAgyrBの塩基配列をDNAシーケンサーを用いて常法に従って決定した。gyrBの塩基配列を決定するために、増幅断片のN末端とC末端部分もUP-1S、UP-2Srプライマー（山本、原山, Appl. Environ. Microbiol. 61:1104-1109, 1995）を用いて決定した。さらに決定配列を伸展するためにUP-1Sを用いて得られた塩基配列から他のプライマーを作製した。増幅断片の全塩基配列はおおよそ1200bpであり、図1、図2に示した。この塩基配列の情報をを用いて、腸炎ビブリオを他の細菌から検出、同定する21bpのプライマーを作製した。これらのプライマーは、配列番号1および2を含み、そしてプライマーセットとして利用可

能である。

【0020】この新規のプライマーは既存のPCRを用いたアッセイ法(Saiki et al., Science 239:487-491, 1988)において有用である。このプライマーはサンプル中の目的とするDNAを増幅するのに用いられ、DNA量を十分検出できるようにする。増幅段階に続いて、検出段階はDNA検出に有効な方法であればどんな方法でもよい。例えば、アガロースゲル電気泳動などが用いられる。目的とするDNAはテンプレートとして機能する。サンプル中のテンプレートDNAの増幅はプライマーペアを二重DNAと処理することにより行われる。この処理により各核酸配列に相補的な配列が伸長する。この伸長し生成した配列はさらにプライマーのテンプレートとして機能する。この処理プロセスは、DNAの変性、プライマーと相補的な配列とのアニーリング、DNAポリメラーゼ(例、Taq polymerase)によるプライマーの伸長からなり、目的とする配列の存在を検出するのに必要な量のDNAが生成されるまで繰り返す。PCR法による増幅条件は後述の実施例3にまとめた。

【0021】増幅に次いで増幅した配列をアガロースゲル電気泳動により検出する。プライマーペア〔VP1(配列番号1)、VP2(配列番号2)〕はgyrB遺

伝子配列を目的部分として用いた場合285bpの配列を増幅する。ATCC, JCM, CDC, NCIMBのコレクションから得たビブリオ属の37種の株について285bpの増幅を行った。これらの細菌の染色体DNAは常法(Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, 1989)にしたがって調製した。1μgの目的DNAを用い、PCR法を行った。285bpの特異的なバンドは腸炎ビブリオにのみ認められ、他の菌種ではいずれにおいても認められなかった(表1)。しかし、山本、原山(1995)らによるプライマーセット(UP-1、UP-2r)を用いたPCR増幅では1.2kbのgyrB部分を検出したので、DNAGyraseBサブユニットの存在は確かめられた。これらの知見から本発明のプライマーは腸炎ビブリオ特異的であり、この病原菌を検出するのに用いることができる。

【0022】

【表1】

S.no.	Microbes	Strain number	PCR results of <i>gyrB</i>	
			1.2-kb	285bp
1	<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC35048	+	-
2	<i>Vibrio albensis</i>	ATCC14547	+	-
3	<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC17749	+	-
4	<i>Vibrio campbelli</i>	ATCC25920	+	-
5	<i>Vibrio carchariae</i>	ATCC35084	+	-
6	<i>Vibrio cholerae</i> O1	PI418	+	-
7	<i>Vibrio cholerae</i> non O1	NR	+	-
8	<i>Vibrio cincinnatiensis</i>	ATCC35912	+	-
9	<i>Vibrio costicola</i>	ATCC33508	+	-
10	<i>Vibrio diazotrophicus</i>	ATCC33466	+	-
11	<i>Vibrio fischeri</i>	ATCC7744	+	-
12	<i>Vibrio fluvialis</i>	JCM3752	+	-
13	<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC35016	+	-
14	<i>Vibrio gazogenes</i>	ATCC29988	+	-
15	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC14126	+	-
16	<i>Vibrio hollisae</i>	CDC75-80	+	-
17	<i>Vibrio logei</i>	ATCC29985	+	-
18	<i>Vibrio marinus</i>	ATCC15381	+	-
19	<i>Vibrio mediterranei</i>	ATCC43341	+	-
20	<i>Vibrio metschnikovii</i>	ATCC7708	+	-
21	<i>Vibrio mimicus</i>	CNS9582	+	-
22	<i>Vibrio mytili</i>	NCIMB13275	+	-
23	<i>Vibrio natriegens</i>	ATCC14048	+	-
24	<i>Vibrio navarrensis</i>	NCIMB13120	+	-
25	<i>Vibrio nereis</i>	ATCC25917	+	-
26	<i>Vibrio nigrivulvatus</i>	ATCC27043	+	-
27	<i>Vibrio ordalii</i>	ATCC33509	+	-
28	<i>Vibrio orientalis</i>	ATCC33934	+	-
29	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC17802	+	+
30	<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC15338	+	-
31	<i>Vibrio salmonicida</i>	ATCC43839	+	-
32	<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC33125	+	-
33	<i>Vibrio tubiashii</i>	ATCC19109	+	-
34	<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 2046	+	-
35	<i>Listonella anguillarum</i>	ATCC19264	+	-
36	<i>Listonella pelagia</i>	ATCC25916	+	-
37	<i>Photobacterium damela</i>	ATCC33539	+	-

< Strain number >

ATCC: American Type Culture Collection

JCM: Japan Collections of Microorganisms

NCIMB: National Collections of Industrial and Marine Bacteria

CDC: Centre for Disease Control

上記以外は菌株名

【0023】同様に、Aeromonas, Alteromonas, Marinomonas, Shigella, Shewanella, Salmonella, Escherichia属またはStaphylococcus aureusの標準株についても*gyrB*と腸炎ビブリオ特異的な285bp配列の検出を行った。

表2に示したようにいずれの株においても*gyrB*の存在は認められたが、腸炎ビブリオ特異的285bp配列は認められなかった。

【0024】

【表2】

S.no.	Microbes	Strain number	PCR results of gyrB	
			1.2-kb	285bp
1	<i>Alteromonas atlantica</i>	ATCC19262	+	-
2	<i>Alteromonas carrogeenovara</i>	ATCC43555	+	-
3	<i>Alteromonas citrea</i>	ATCC29719	+	-
4	<i>Alteromonas espejiana</i>	ATCC29659	+	-
5	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	ATCC14393	+	-
6	<i>Alteromonas luteoviolaceae</i>	ATCC33492	+	-
7	<i>Alteromonas macleodii</i>	ATCC27126	+	-
8	<i>Alteromonas tetraodonis</i>	NCIMB13177	+	-
9	<i>Alteromonas undina</i>	ATCC29660	+	-
10	<i>Marinomonas communis</i>	ATCC27118	+	-
11	<i>Marinomonas vaga</i>	ATCC27119	+	-
12	<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC19570	+	-
13	<i>Escherichia coli</i>	ATCC25922	+	-
14	<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC13311	+	-
15	<i>Shewanella putrefaciens</i>	ATCC8071	+	-
16	<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC13313	+	-
17	<i>Shigella sonnei</i>	ATCC29930	+	-
18	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC12600	+	-

【0025】腸炎ビブリオには種々の表現型、血清型、毒素産生型が報告されている。腸炎ビブリオによって産生される毒素の一つである熱安定なヘモリジンに特異的なプローブが報告されている(Nishibuchi et al., FEMS Microbiol. Lett. 55:251-256, 1990)。これらの毒素特異的プローブは臨床的には重要であるが、すべてのタイプの腸炎ビブリオを検出することはできない。食品の腸炎ビブリオによる汚染を防ぐには、食品、あるいはその環境中のすべてのタイプの腸炎ビブリオを検出する必要がある。食品、水、土壌など種々のものから単離された腸炎ビブリオについてその表現型、血清型、毒性を調べた。これら118株すべての腸炎ビブリオの株についてプライマーVP1、VP2を用いたPCR法を行った。あきらかに285bpの配列が増幅された。結果を表3に示す。表3の株は食品、土、水または糞便から分離同定した株であり、一部は岡山大学篠田先生、九州大学山本先生から譲り受けた。表3に示すように、同様に種々のものから単離された20株のビブリオ アルジノリティカスにおいては285bpの配列の増幅は認められなかった。

【0026】

【表3】

【0027】PCR法を用いたアッセイ系の評価を行うために、腸炎ビブリオATCC17802株のゲノムDNAの希釈液を調製し、PCR増幅のテンプレートとして用いた。1ngのゲノムDNAしか含有しない希釈液からもプライマーVP1、VP2を用いた増幅により検出できた。感度をngレベルからpgレベルにあげるために、電気泳動したDNAをサザンブロットにかけた。腸炎ビブリオATCC17802株の培養細胞の希釈液で上記プライマーによる増幅を行ったところ、およそ1cfu/reaction tubeの検出限界であった。このようにPCR法による検出限界は1cfu/10μlまたは10³cfu/mlであった。プレーティ

ング、選択的寒天培地による検出は1生存細胞を検出する感度を持つが労力と時間を必要とする。

【0028】PCR法によるアッセイ系は従来の検出法に比べ、細菌の検出法に必須の速度、感度、特異性のバランスにおいて優れており、有用である。

【0029】

【実施例】本発明を実施例によって説明する。実施例は実施の1態様であり、本発明を限定するものではない。

【0030】実施例1

従来法による食品中の腸炎ビブリオの単離

25gの食品サンプルにアルカリペプトン水〔日水製薬(株)製〕を加え腸炎ビブリオATCC17802株を接種し、37℃で18時間培養した。1白金耳量の培養液をTCBS寒天培地に画線接種し、37℃で24時間培養した。すべての緑色コロニーをさらにT₁N₁寒天培地(Bacto tryptone 1%, NaCl 1%, 寒天1.5%含有蒸留水)上で単離した。よく単離されたコロニーを生化学的試験にかけた。以下の性質を示す菌株を典型的な腸炎ビブリオと同定した。オキシダーゼ、リジンデカルボキシラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、ゼラチナーゼ、リパーゼ、キチナーゼ陽性；インドール産生；食塩濃度0.5~8%、42℃で生育する；O/129(150μg)に対する感受性有り；グルコース、マンニトール、マンノースから酸を生成；アルギニンデヒドロゲナーゼ、アルギナーゼ陰性；食塩濃度0%では生育しない；蔗糖、乳糖、サリシンから酸を生成しない。

【0031】実施例2

染色体DNAの単離

腸炎ビブリオの株をTSB培地(栄研製)中で37℃、約24時間振とう培養した。細胞は遠心分離(トミー精工製)して(15,000rpm, 15分間、4℃)採取し、10mlの滅菌TE緩衝液(10mM Tris, 1mM EDTA, pH8.0)に懸濁させた。細胞をリゾチーム(最終濃度1mg/ml；和光製)により溶

解し、静かに振とうしながら、37℃に20分間保持した。この溶解した細胞にSDS（最終濃度0.5%）を加え、ゲノムDNAが完全に分解するまで65℃でインキュベートした。蛋白とRNAを変性させるために、それぞれプロテイナーゼK（最終濃度500μg/ml）とRNase（最終濃度5μg/ml）を加え、37℃でそれぞれ30分間、60分間インキュベートした。サンプルは緩衝フェノール（GIBCO/BRL）で3回、フェノール：クロロホルム（1：1）で1回、クロロホルム：イソアミルアルコール（24：1）で1回抽出した。清澄な上清を得るために遠心分離を行い、DNAは2倍量の氷冷エタノール：3M酢酸ナトリウム（10：1）で沈殿させた。この反応液を-20℃で一晩保存した。沈殿したDNAは遠心分離で濃縮し、エタノールを減圧留去した。この乾燥DNAをTE緩衝液に溶解し、DNAテンプレートとして用いた。DNAの純度はアガロースゲル電気泳動により調べ、DNA濃度は分光光度計によって測定した。

【0032】実施例3

PCR法によるアッセイ

サンプル調製

DNAを抽出しない菌の全細胞もテンプレートとして用いた。この場合、寒天培地で生育した新鮮な菌細胞を用いた。液体培地で生育した細胞を用いる場合には遠心分離により菌細胞を分離し、PBS緩衝液（pH7.5）で1度洗浄し、適当な数の菌細胞を用いた。場合によってはフェノール・クロロホルムによりDNAを抽出し、PCR増幅のテンプレートとして用いた。

【0033】PCR増幅条件

PCRアッセイはDNA Thermal Cycler（Perkin Elmer）で行った。反応液100μl（Tris-HCl 100mM, MgCl₂

配列

CGG CGT GGG TGT TTC GGT AGT

配列番号：2

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

TCC GCT TCG CGC TCA TCA ATA

15mM, KCl 500mM, pH8.3)は、ゲノムDNA100ng、200μMのdNTPs、1μMのプライマーを含有する。DNA変性は94℃、60秒間、アニーリングは60℃、60秒間、DNA伸長は72℃、120秒間で、30サイクル行った。増幅に次いで、検出はゲル電気泳動によって行った。サンプル20μlはアガロースゲル電気泳動（1%アガロース、Seakem ME, FMC Bioproducts, Rockland, Maine）にかけた。DNAバンドはエチジウムブロマイド溶液で10分間染色後、紫外線照射して観察した。

【0034】

【発明の効果】腸炎ビブリオのgyrB遺伝子に特異的に反応して、他のビブリオ種及びビブリオ属以外の菌株から区別、同定できるようなプライマーを提供することができた。腸炎ビブリオ特異的プライマーにより、DNAの抽出等の操作なしで、菌細胞からの腸炎ビブリオ特異的な285bpのgyrB遺伝子断片をPCR法により検出できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】腸炎ビブリオ ATCC17802株のgyrB塩基配列を示す図面である。

【図2】ビブリオ アルジノリティカス ATCC17749株のgyrB塩基配列を示す図面である。

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：ゲノミックDNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：ゲノミックDNA

【表3】

S.no.	Name	Strain no.	神奈川現象	PCR
1	<i>V. parahaemolyticus</i>	33-7	+	+
2	<i>V. parahaemolyticus</i>	33-8	+	+
3	<i>V. parahaemolyticus</i>	33-10	+	+
4	<i>V. parahaemolyticus</i>	V83	+	+
5	<i>V. parahaemolyticus</i>	WP-1(y)	+	+
6	<i>V. parahaemolyticus</i>	WP-1	+	+
7	<i>V. parahaemolyticus</i>	39-11	-	+
8	<i>V. parahaemolyticus</i>	46-11	-	+
9	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3301	-	+
10	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3314	-	+
11	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3321	-	+
12	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3326	-	+
13	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3331	-	+
14	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3343	-	+
15	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3345	-	+
16	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3346	-	+
17	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3354	-	+
18	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3360	-	+
19	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3627	-	+
20	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3629	-	+
21	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3633	-	+
22	<i>V. parahaemolyticus</i>	AQ3634	-	+
23	<i>V. parahaemolyticus</i>	BB22	-	+
24	<i>V. parahaemolyticus</i>	ML34	-	+
25	<i>V. parahaemolyticus</i>	ML159	-	+
26	<i>V. parahaemolyticus</i>	ML1017	-	+
27	<i>V. parahaemolyticus</i>	MY67-6	-	+
28	<i>V. parahaemolyticus</i>	MY73-2	-	+
29	<i>V. parahaemolyticus</i>	OK80-480	-	+
30	<i>V. parahaemolyticus</i>	OKA80-214	-	+
31	<i>V. parahaemolyticus</i>	OKA80-232	-	+
32	<i>V. parahaemolyticus</i>	S53	-	+
33	<i>V. parahaemolyticus</i>	RIMD2210521	-	+
34	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR1-01	-	+
35	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR3-02	-	+
36	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR4-01	-	+
37	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR4-02	-	+
38	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR6-01	-	+
39	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR6-02	-	+
40	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR7-01	-	+
41	<i>V. parahaemolyticus</i>	KBI-01	-	+
42	<i>V. parahaemolyticus</i>	KBI-03	-	+

【表3】

S.no.	Name	Strain no.	神奈川現象	PCR
43	<i>V. parahaemolyticus</i>	KB3-01	-	+
44	<i>V. parahaemolyticus</i>	KB4-01	-	+
45	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-715	-	+
46	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-795	-	+
47	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-839	-	+
48	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-854	-	+
49	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-864	-	+
50	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-868	-	+
51	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-871	-	+
52	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-944	-	+
53	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-347	-	+
54	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-014	-	+
55	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-032	-	+
56	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-048	-	+
57	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-049	-	+
58	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-059	-	+
59	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-084	-	+
60	<i>V. parahaemolyticus</i>	KV-095	-	+
61	<i>V. parahaemolyticus</i>	OKA80-223	-	+
62	<i>V. parahaemolyticus</i>	RIND2210517	-	+
63	<i>V. parahaemolyticus</i>	RIND2210518	-	+
64	<i>V. parahaemolyticus</i>	RIND2210519	-	+
65	<i>V. parahaemolyticus</i>	RIND2210520	-	+
66	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR4-03	-	+
67	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR5-01	-	+
68	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR5-02	-	+
69	<i>V. parahaemolyticus</i>	AR5-03	-	+
70	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-48	-	+
71	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-100	-	+
72	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-200	-	+
73	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-333	-	+
74	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-346	-	+
75	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-477	-	+
76	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-714	-	+
77	<i>V. parahaemolyticus</i>	93-422	-	+
78	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-1	+	+
79	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-2	+	+
80	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-3	+	+
81	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-4	+	+
82	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-5	+	+
83	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-6	+	+
84	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-7	+	+

【表 3】

S.no.	Name	Strain no.	神奈川現象	PCR
85	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-8	+	+
86	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-9	+	+
87	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-10	+	+
88	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-11	+	+
89	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-12	+	+
90	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-13	+	+
91	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-14	+	+
92	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-15	+	+
93	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-16	+	+
94	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-17	+	+
95	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-18	+	+
96	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-19	+	+
97	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-20	+	+
98	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-21	-	+
99	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-22	-	+
100	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-23	-	+
101	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-24	-	+
102	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-25	-	+
103	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-26	-	+
104	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-27	-	+
105	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-28	-	+
106	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-29	-	+
107	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-30	-	+
108	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-31	-	+
109	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-32	-	+
110	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-33	-	+
111	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-34	-	+
112	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-35	-	+
113	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-36	-	+
114	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-37	-	+
115	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-38	-	+
116	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-39	-	+
117	<i>V. parahaemolyticus</i>	TUF-K-40	-	+
118	<i>V. alginolyticus</i>	OKA87-003	-	-
119	<i>V. alginolyticus</i>	OKA87-006	-	-
120	<i>V. alginolyticus</i>	ATCC17749	-	-
121	<i>V. alginolyticus</i>	10-1	-	-
122	<i>V. alginolyticus</i>	13-1	-	-
123	<i>V. alginolyticus</i>	13-2	-	-
124	<i>V. alginolyticus</i>	OK82-545	-	-
125	<i>V. alginolyticus</i>	172	-	-
126	<i>V. alginolyticus</i>	83-1074	-	-
127	<i>V. alginolyticus</i>	OKA87-001	-	-
128	<i>V. alginolyticus</i>	OKA87-002	-	-

【表 3】

129	<i>V. alginolitycus</i>	OKA87-004	-	-
130	<i>V. alginolitycus</i>	OKA87-007	-	-
131	<i>V. alginolitycus</i>	OKA87-008	-	-
132	<i>V. alginolitycus</i>	OKA87-013	-	-
133	<i>V. alginolitycus</i>	S-13	-	-
134	<i>V. alginolitycus</i>	6624	-	-
135	<i>V. alginolitycus</i>	6640	-	-
136	<i>V. alginolitycus</i>	OKA80-21	-	-
137	<i>V. alginolitycus</i>	OKA82-582	-	-
138	<i>V. cholerae</i> non-01	FK	-	-
139	<i>V. cholerae</i> non-01	MR	-	-
140	<i>V. fluvialis</i>	FK	-	-
141	<i>Vibrio harveyi</i>	NCIMB390	-	-
142	<i>Vibrio harveyi</i>	NCIMB394	-	-
143	<i>Vibrio harveyi</i>	NCIMB1871	-	-
144	<i>Vibrio harveyi</i>	NCIMB1896	-	-
145	<i>V. vulnificus</i>	FK	-	-
146	<i>Vibrio spp.</i>	KV-001	-	-
147	<i>Vibrio spp.</i>	KV-002	-	-
148	<i>Vibrio spp.</i>	KV-004	-	-
149	<i>Vibrio spp.</i>	KV-005	-	-
150	<i>Vibrio spp.</i>	KV-006	-	-
151	<i>Vibrio spp.</i>	KV-019	-	-
152	<i>Vibrio spp.</i>	KV-022	-	-
153	<i>Vibrio spp.</i>	KV-077	-	-
154	<i>Vibrio spp.</i>	KV-091	-	-
155	<i>Vibrio spp.</i>	KV-085	-	-
156	<i>Vibrio spp.</i>	KV-100	-	-
157	<i>Vibrio spp.</i>	KV-101	-	-
158	<i>Vibrio spp.</i>	KV-107	-	-
159	<i>Vibrio spp.</i>	KV-121	-	-
160	<i>Vibrio spp.</i>	80-175	-	-
161	<i>Vibrio spp.</i>	83-1071	-	-

【図1】

```

ngccggggga aaattcgang ataactcgta caaagtatac ggcgggtcttc accgggtggg 60
tgatttggta gtaacgcaac tctcagaaan agtggtacta accatccatc gtggggttca 120
tatccacacg caaacttaac gtctagggtga gontgaanog oototagogg ttgggggtga 180
tncggataaa actggtacac aaattcggtt ctggccaagt gcagaaactt tctctaacac 240
tgatttccat tncgacatcc tagcaaaagc totgggtgag ctatcggtct tgaattcagg 300
cgttctctat agcgttatig atgagcgoga agcggaacag caagatccat tcatgtatga 360
agtggttatt caagcgttgc ttccgacatt caaccccaac aaaccccaa tcatgtatga 420
aatcttccac ttgagattag aaagtgaaga gggattttcg gtagaagtgg caatggaatg 480
gacgcatggt ttccaaagga acattctctg ttccaccac acattccac agcgggtggg 540
tgtaactcac attggtggtt taaggtgccc aataaccgt acgtataaac gtttatgga 600
taaggaaggg ttctcgaaaga aagcgaacac ggcgaagtc ggcgaagtc ggcgaagtc 660
tttgactgac gttgtttcag taaggtgccc tgatccaaa tctctgagcc aaacaaaga 720
caactggtt tcttctgaag tgaaatcagc ggttgaaatc gcatggggg agaatatc 780
tgatttctg gtgcgaacac caagtgaagc gaattgggt ttttggaaa tcatcgatgc 840
agcactgca cgtgaagcgc caagtgaagc ggtgaagtc actgtgta aaggggggt 900
agcactgca cgtctcaccn cngmacttg cagactgta ggaataagat cgggactct 960
ntgaactata catttggtgag ggtgactctg cgggtggttc agcgaagcag ggtgactat 1020
gtagaatca ggcactccct accactgaaa ggtagatcc tgaacgtga aaagcaggt 1080
ttgcgaaga tttgttttc gcaagagtt gaaacgtta atacagant tggctgtgt 1140
atcggtgtg acgagacaa accggaacaa ctggtttacc caacatcat catcatgacc 1200
acacagacc taga 1214

```

【図 2】

```

gcggggggtta aattcgagca taacacaaac aaattatcng gbggtctccn ctgggttaagt 60
gtntcantaa taacgcactc utcagagaa gttgagctaa cgaattcatcg tgggtggcat 120
atccatacgc aaacctacgg ccattggtgag cctcaacgcc actagccggtt ggggtgata 180
cggatataaac cggatcacaa attcggtttct ggcacagtcg cgaagcgttc tctaacactg 240
agttccacta tgacattctg gggaaacgcc tgggtgaact gtcattcctg aactctgggtg 300
tgtcnatcan attcggtggt gaaacgtgaa cggacaaaca tgatcacttc atgtatgaag 360
gtgggtattca ngcgttcgtt gatcacctaa acaccantaa aacgcacatc atcgnggggt 420
cttccacttt aactctgagc gtgaagacgg cacttcagtt gaagtggaga tgcattggaa 480
cgaatgggttc caagagaaac tcttcctggt taccacaaat atccacacgc gtgttgggtg 540
taactaagtt gctgggttcc gtgctgctgt aacacgtaca ttgaacagct ttatggataa 600
agaaggtttc tcaagaaag cgaanacgc gacttcaggg gaagatgccc gtgaaggtct 660
aactgaggtt gtttcggtga aagtgcctga tctaaagttc tcaagccaaa caaagacaa 720
actggtttct tctgaagtg aatcagctgt tgagtctgca atgggtgaaa aactgtctga 780
gttcttgatt gagaacccga cagaagcgaa gatggtttgt tcaaaatca tcaatgagc 840
acgtgctcgt gaagcagcgc gtaagctcgt tgaatgacg cgcgttaag gtgactaga 900
cctagctcgc ttcmaaggt aaghtgcaga ctgtcagaa aagatccgg cactnttga 960
actaanata gtggaggtg antcggcagg cgttcmaa ascaagccg taacctgaag 1020
aaccaagcga tcaacogct aagagtgag attcttaac taguaaagc acgttcagac 1080
aagatgctat ntctctcga agtagaaca ctgacccg cattaagttg tggatcggc 1140
cgtgacgaa acaaccogga cangctcgg gacmacaaca tntcatcat gaogacgca 1200
gacgtaga 1200

```

【手続補正書】

【提出日】平成 8 年 4 月 9 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】さらに V. vulnificus のサイト
リジン遺伝子 (hlyA) 配列の部分からの共有結合で

ラベルしたオリゴヌクレオチド DNA プローブが作製された。これらのプローブは非毒素性 V. vulnificus とは反応せず、したがって全ての V. vulnificus を検出しない。同様に、毒性因子 (tdh、trh 遺伝子) をターゲットにした他の分子学的方法も毒素を産生する腸炎ビブリオを検出することはできる。しかし、この毒性因子を用いた場合、すべての腸炎ビブリオを検出することはできない。